

STABILIZATION OF ENZYME ACTIVITY IN BLOOD

Publication number: JP11192084

Publication date: 1999-07-21

Inventor: YOSHINO MANABU; KAMIYAMA MICHINOBU

Applicant: EIKEN CHEMICAL

Classification:

- international: C12N9/00; C12Q1/25; C12N9/00; C12Q1/25; (IPC1-7):
C12N9/00; C12Q1/25

- European:

Application number: JP19970367617 19971229

Priority number(s): JP19970367617 19971229

Report a data error here

Abstract of JP11192084

PROBLEM TO BE SOLVED: To make readily storable a blood specimen for measuring enzyme activity such as a blood component for directly showing its relation to a disease and to stabilize enzyme activity in blood derived from a blood corpuscle component or the like, by making a reducing agent coexist in a blood specimen. SOLUTION: One or plural reducing agents such as 2-mercaptoethanol, dithiothreitol, cystine or the like in the concentration of 5-100 mM based on blood is added to a blood specimen to stabilize enzyme activity in blood of an enzyme composed of 2'-5' oligoadenylate synthase, adenosine deaminase, etc., derived from blood corpuscle component or the like. It is considered that the stabilization of enzyme activity in a blood facilitates the preservation of a blood specimen, make accurately measurable enzyme activity in a blood corpuscle component directly showing its relation to the state of a disease and contributes to the progress of a measurement system of an enzyme in blood.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平11-192084

(43) 公開日 平成11年(1999) 7月21日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

C 1 2 N 9/00

C 1 2 N 9/00

C 1 2 Q 1/25

C 1 2 Q 1/25

審査請求 未請求 請求項の数17 F D (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願平9-367617

(22) 出願日 平成9年(1997)12月29日

(71) 出願人 000120456

栄研化学株式会社

東京都文京区本郷1丁目33番8号

(72) 発明者 吉野 学

栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学

株式会社野木事業所内

(72) 発明者 神山 道信

栃木県大田原市下石上1381-3 栄研化学

株式会社那須事業所内

(54) 【発明の名称】 血液中の酵素活性の安定化方法

(57) 【要約】

【目的】本発明の目的は、血液試料中の酵素活性の安定化に有る。特にリンパ球中に多く含まれる2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(2-5AS)の安定化を目的とする。

【構成】本発明は、血液試料に還元剤を共存させることによって達成される。還元剤としては2-メルカプトエタノール(2ME)が例示され、2MEを含有するHEPES緩衝液を酵素活性安定化剤として使用する。

【効果】本発明は、均質化した血液試料中の酵素活性を高度に安定化する。例えば、2-5AS活性を4℃保存でも少なくとも7日間に亘って安定に維持する。この技術は血球成分に由来する酵素の安定化に有用であり、病態との関連をダイレクトに示す血球成分中の酵素活性を安定化し、試料の保存を容易としたので血球中酵素の測定系の発展に貢献すると考えられる。

【特許請求の範囲】

【請求項1】還元剤を共存させることによって血液中の酵素活性を安定化する方法

【請求項2】活性を安定化すべき酵素が、血球成分に由来するものである請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項3】活性を安定化すべき酵素が、白血球または赤血球に由来するものである請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項4】活性を安定化すべき酵素が、リンパ球に由来するものである請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項5】活性を安定化すべき酵素が、2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素である請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項6】活性を安定化すべき酵素が、アデノシンデアミナーゼである請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項7】還元剤が、SH化合物である請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項8】還元剤が、2-メルカプトエタノール、ジチオトレイトール、システインよりなる群より選ばれるひとつまたは複数の還元剤である請求項1記載の酵素活性を安定化する方法

【請求項9】還元剤が、2-メルカプトエタノールである請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項10】還元剤を血液に対して5~100mMで用いる請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項11】血液が血球成分を破壊して均質化された状態にあることを特徴とする請求項1の酵素活性を安定化する方法

【請求項12】次の工程a)~d)を含む血液中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性測定方法

a)採取した血液を還元剤を含む希釈液で希釈する工程

b)希釈した血液中の血球成分を破壊して均質化する工程

c)2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素の基質を与えて酵素反応を行う工程

d)酵素反応の結果生じる変化を観察する工程

【請求項13】次の工程a')~d')を含む血液中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性測定方法

a')採取した血液中の血球成分を破壊して均質化する工程

b')均質化した血液を還元剤を含む希釈液で希釈する工程

c)2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素の基質を与えて酵素反応を行う工程

d)酵素反応の結果生じる変化を観察する工程

【請求項14】血球成分の破壊を、凍結融解により達成する請求項13もしくは請求項14の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性測定方法

【請求項15】必要に応じて工程b)もしくは工程b')後の均質化試料を冷所で保存する請求項13もし

くは請求項14の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性測定方法

【請求項16】還元剤を含有することを特徴とする血液試料中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性安定化剤

【請求項17】少なくとも2-メルカプトエタノールを5~100mM、酢酸マグネシウムを0.5~50mM、塩化カリウムを20~100mM、グリセロールを10~50%含有する、1~100mMのHEPES緩衝液(pH7~8)よりなる血液試料中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性安定化剤

【発明の詳細な説明】

【0001】

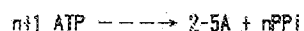
【産業上の利用分野】本発明は、血液中の酵素活性の安定化に関するもので、血球成分に含まれる酵素の安定化に関する。特にリンパ球中に多く含まれる2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素(以下2-5ASと略す)や赤血球に多く含まれるアデノシンデアミナーゼ(ADA)等の血球中に含まれる酵素の溶血させて均質化した血液中での酵素活性の安定化に関する。

【0002】2-5ASは、リンパ球等においてインターフェロン(IFN)により誘導される酵素であり、B型肝炎C型肝炎等のIFN治療の有効な患者ではその上昇率も高いとされている。この2-5ASは、2本鎖RNA(以下dsRNAと省略する)の存在下でアデノシン3リン酸(以下ATPと省略する)を基質としてアデニル酸を(2'-5')ホスホジエステル結合で重合し、2'-5'オリゴアデニル酸(以下2-5Aと省略する)を産生する活性を持っている[1]。

【0003】

【化1】

2-5AS



【0004】2-5ASに合成された2-5Aの役割は、ウイルスのmRNAのキャップ形成の阻止、細胞制御、細胞の分化などに関係があり、2-5Aが細胞内に誘導された場合には、タンパク質合成やウイルスの複製が阻止される。以上の生体防御の機序を利用し、2-5AS活性値を各種微生物(ウイルス、細菌、マイコプラズマ等)の感染やインターフェロン治療効果の指標とできることが確認された。現在では既に放射免疫測定法(以下RIAと省略する)を利用した2-5AS活性の測定用キットも市販されている。

【0005】アデノシンデアミナーゼ(ADA)はプリン体の分解と再利用に関する酵素で、アデノシンのアミノ基を加水分解し、イノシンとアンモニアを精製する酵素で、血清中のみならず赤血球やリンパ球にも存在することが知られている。また肝疾患、悪性腫瘍、白血病、痛風等でADA活性が上昇することが知られている。

【0006】またその他にも血球成分に含まれる酵素としては、ラクテートデヒドロゲナーゼ、イソクエン酸デヒドロゲナーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、 β -グルクロニダーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、アデニレートキナーゼ、アルドラーゼ、ピルビン酸キナーゼ、酸性ホスファターゼ、リゾチームなど、多数が知られており、それぞれ病態との関連が研究されている。

【0007】

【従来技術の問題点】2-5ASやADAは本来細胞内酵素であり、現在測定されている血清中のそれらの酵素活性は血球成分や組織の破壊の過程で細胞から漏れ出た酵素の活性を測定していると考えられている。特に2-5ASは非常に不安定な酵素で、血清中の2-5AS活性は、採血条件や保存条件の影響を大きく受けるとされている。そのため、血液中のリンパ球を分離してその中の2-5AS活性を測定する方が実際の臨床症状と相関性が高いといわれている〔2〕〔3〕。

【0008】確かに、血液中のリンパ球を単離し、直接リンパ球内の2-5AS活性を測定する方がIFNなどの影響、治療効果をすばやく捉えられると考えられる。しかし、血液中のリンパ球を分離して酵素を抽出するには煩雑な操作とかなりの時間が必要となり、臨床検査として多数の検体を取り扱うには不相当である。それ故、より簡便な測定法として、溶血させた血液試料中の2-5AS活性の測定の検討が行われている〔4〕〔5〕。この方法は血液を凍結融解もしくは物理的刺激により溶血させ、イーグルMEM培地で30倍に希釈し、その2-5AS活性を市販の2-5AS活性測定RIAキットで測定するものである。それによると血液試料中の2-5AS活性は血清中の活性の50~100倍高値を示し、また特にIFN治療中の患者で非常に高い活性を示し、IFN治療のマーカーとしての有用性が示唆されている。

【0009】しかしながら全血血液中の2-5ASの活性は、血清中よりも安定ではあるが、それでも、冷所24時間保存で約80%、冷所48時間保存で50~70%に低下し、実際の臨床検査の場で使用するには安定性が不足している。そのため上記文献では全血血液は使用時まで-80℃で保存し、使用時に凍結融解により溶血し血液試料を調製し、調製した血液試料中の2-5AS活性を測定している。なお以下にイーグルMEM培地の組成を次に示す。これは還元剤や緩衝成分を含むものではない。

【0010】イーグルMEM培地組成：(単位：mg/L)

L-Arginine-HCl	126.0
L-Cystine-Na ₂	28.4
L-Glutamine	292.3
L-Histidine-HCl/H ₂ O	41.9
L-Isoleucine	52.5
L-Leucine	52.5

L-Lysine/HCl	73.3
L-Methionine	14.9
L-Phenylalanine	33.0
L-Threonine	47.6
L-Tryptophan	10.2
L-Tyrosine	36.2
L-Valine	46.9
CaCl ₂	200.0
KCl	400.0
MgSO ₄	97.7
NaCl	6800.0
NaHCO ₃	2000.0
NaH ₂ PO ₄ /H ₂ O	140.0
Choline Chloride	1.0
D-Ca Panthotenate	1.0
Folic Acid	1.0
i-Inositol	2.0
Nicotinamide	1.0
Pyridoxal/HCl	1.0
Riboflavin	0.1
Thiamin/HCl	1.0
Dextrose	1000.0
Phenol Red/Na	17.0

【0011】

【発明が解決しようとする課題】現在、血中2-5AS活性測定は血清試料を用いる方法がほとんどであるが、血球成分から漏出した一部分の酵素の活性を測定しているに過ぎず、また安定性に関しても血清試料は経時的に急激に活性を失う。これに対し血球成分を破壊し均質化して均一な溶液状態とした血液試料を用いることにより、より直接的に潜在する2-5AS酵素活性の絶対量を測定することができるようになった。しかし血液試料中の2-5AS活性の安定性に関しては、未だ不満があり、実際の臨床検査の場で用いるには安定性が不足している。本発明の目的は、全血試料中の酵素活性の安定化に有る。特に均質化した血液試料中の血球成分に含まれる酵素を通常の冷蔵庫等で保存可能とし、実際の臨床検査の場で使用できるように安定化する技術を提供することが本発明の課題である。特に均質化した血液中の2-5AS活性を安定性することを目的とする。

【0012】精製した酵素の安定化に還元剤やSH化合物が有効であることが知られていた。例えばウリカーゼの安定化にアスコルビン酸等の還元剤を用いる方法

〔6〕、SH化合物で精製ウレアーゼを安定化する方法〔7〕〔8〕、SH化合物でLDH、MDH、HK、G6PDHを含有する試薬を安定化する方法〔9〕〔10〕〔11〕〔12〕が知られていた。しかし、これらの方法は精製酵素の安定化法であり、またGOT、GPT、グルコース測定用試薬の安定化法であり、還元剤(SH化合物)やその他の成分で目的とする酵素や測定

用試薬の安定化を達成している。これらの報告中には全血中の酵素活性の安定化に還元剤が有効であるとはまったく記載されておらず、その示唆すらもない。

【0013】

【問題を解決するための手段】本発明の課題は、血液に還元剤を共存させることによって達成される。ここで活性を安定化すべき酵素とは、血球成分に由来するもの、白血球または赤血球に由来するもの、特にリンパ球に由来するものである。リンパ球に由来する酵素としては例えば2-5ASが挙げられ、赤血球由来の酵素の例としては、ADAが挙げられる。また血液中に共存させる還元剤としては、例えば2-メルカプトエタノール(2ME)、ジチオトレイトール(DTT)、システインが例示され、その中でも2-メルカプトエタノール(2ME)が本発明には好ましい。これらの還元剤は単独で用いても、また複数を組み合わせても良い。その濃度は血液に対して5~100mMで用いることが好ましい。また、本発明の還元剤は、均質化の有無に関わりなく全血中の酵素活性を安定化するが、酵素活性の測定が均質化された血液試料を検体として行われるので、血液は還元剤を加えた均質化血液試料として測定時まで保存するのが望ましい。

【0014】また本発明は、次の工程a)~d)を含む血液中の2-5ASの活性測定方法を提供する。

- a) 採取した血液を還元剤を含む希釈液で希釈する工程
- b) 希釈した血液中の血球成分を破壊して均質化する工程
- c) 2'-5' オリゴアデニル酸合成酵素の基質を与えて酵素反応を行う工程
- d) 酵素反応の結果生じる変化を観察する工程

【0015】本発明の測定方法において、まず血液は抗凝固剤を含んだ採血管で採血される。抗凝固剤としては、ヘパリン、EDTA(及びその塩)、クエン酸ナトリウム、フッ化ナトリウム、シュウ酸ナトリウムなどの一般的な抗凝固剤が使用可能であり、その中でもヘパリンやEDTA-2Naが用いられる。次いで工程a)で血液は希釈される。この時用いる採取した血液を希釈する希釈液は、ヒトの2-5ASがpH7.0~8.0、好ましくはpH7.5~7.8で最大の活性を示すとされているので、この範囲のpHを与える緩衝液が好ましい。具体的には、還元剤を含んだ1~100mM、好ましくは5~30mMのHEPES(2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazyl] ethansulfonic acid)緩衝液を示すことができる。また希釈の倍数は10倍程度が適当である。

【0016】ついで工程b)において希釈した血液中の血球成分を破壊して均質化する。血球成分の破壊均質化は、凍結融解、溶血剤の添加、超音波破碎、あるいは機械的刺激による溶血といった一般的な手段により達成される。溶血剤としてはサポニン、Nonidet-P4

0等の界面活性剤等を含ませて低浸透圧とした溶血剤を使用する。またピペット等で強く撹拌したり、超音波による機械的刺激で溶血しても良い。しかし、界面活性剤によっては酵素反応を阻害するものもあり、血球成分中の酵素によっては機械的な刺激に弱いものも存在するので、活性を安定化すべき酵素によって、溶血方法は選択される。凍結融解による溶血方法は一般的であり、酵素に対するダメージが少ない方法の一つと考えられている。本発明において溶血方法は、凍結融解を2回または3回繰り返すことが好ましい。凍結は例えばドライアイス-アルコール混液で-80℃程度に急速冷却・凍結し、溶解は20~40℃程度の温浴で急速融解すると速やかに均質化される。この方法によって均質化された還元剤を含む血液試料は冷蔵庫程度の冷所における保存でも十分安定である。なおこの操作によってリンパ球のみならず赤血球も破壊され着色するが、最終的な酵素反応生成物の測定に着色やヘモグロビンによる酵素的な触媒活性による影響の無い限り問題となることはない。

【0017】なお、上述の均質化した血液試料の作成は工程a) b)の順番を逆とした工程

a') 採取した血液中の血球成分を破壊して均質化する工程

b') 均質化した血液を還元剤を含む希釈液で希釈する工程

によっても達成される。要するに均質化し希釈された血液試料中に還元剤が含まれていることが重要であるので、工程a) b)及びa') b')の順番は問わず、どちらの工程を選択しても作成された血液試料は冷所保存で充分安定となる。また上述の工程では還元剤を含んだ希釈液を用いているが、還元剤を単独で用い、均質化し希釈した血液試料中に別途加えても良い。

【0018】次いで、工程c)において2-5ASの基質ATPを与えて酵素反応を行う。2-5ASは酵素活性の発現に当たって Mg^{2+} のような2価の金属イオンを要求する。したがって工程c)を行うためには、2-5ASの活性を十分に維持するためにこれら2価の金属イオンを供給しておく必要がある。 Mg^{2+} は酢酸マグネシウムのような塩として添加すると良い。またその使用濃度は、反応液中で0.5~50mM、好ましくは3~10mM程度を例示することができる。

【0019】また2-5ASによる酵素反応は、20~50℃の温和な温度条件の下で行うことが好ましい。特に好ましい温度は30~40℃である。また2-5ASはSH酵素であるため、2MEやDTTのようなSH保護剤の共存下で反応を行うと良い。これらの保護剤は本発明の安定化剤として試料中に既に加えられているが、酵素反応時にさらに添加することによって、酵素反応時の失活を抑えることができる。さらに酵素反応時の失活を抑えるために、10~50%程度のグリセロールの添加が有効であることが知られている。また2-5ASの

酵素活性を十分に発現させるために適当な塩濃度を与えるのが好ましい。たとえば塩としてK塩やNa塩を用いる場合、反応液中で20～100mM、好ましくは30～60mMの塩濃度が好適である。

【0020】次いで、工程d) 酵素反応の結果生じる変化を観察する工程に移る。つまり、工程c) において生成する2-5A、ピロリン酸 (PPi)、あるいは消費されるATP等を測定し、血液試料中の2-5ASの活性を決定する工程である。工程c) で2-5ASの酵素反応に必要な条件を与えれば、2-5ASに触媒される反応は酵素活性に律速され、その反応生成物の量は酵素活性に左右される。このような好適な条件を与えれば反応生成物 (または消費される物質) の量を指標として酵素活性を決定することができ、これらの反応生成物の量や濃度はそのまま酵素活性の指標とする事ができる。予め2-5AS酵素の蛋白量と酵素反応生成物の生成速度について検定した標準を用いれば、この標準を基に酵素活性単位として捉えることも可能である。酵素活性の指標となる反応生成物としては、2-5A、そしてピロリン酸を挙げることができる。各生成物の測定方法を以下に具体的に述べる。

【0021】2-5Aの測定法：2-5Aは、酵素、発光物質、蛍光物質、RIといった公知の標識技術を利用した免疫測定法によって測定することができる。特に¹²⁵I標識を用いたRIA法[13]は高い感度を簡単な操作で達成することができるので、本発明における好ましい態様として挙げられる。この他に³²Pによる標識抗原を用いる方法[14][15]も公知であるが、感度や半減期を考慮すると¹²⁵Iの方が有利である。また本出願人も従来のRIA法を改良した2-5A測定法を開発し、既に特許出願している[16]。

【0022】ピロリン酸の測定法：ATPを重合して2-5Aとする時に副産物として生成するのがピロリン酸 (PPi) である。したがってピロリン酸は定量的に生成し、酵素活性の指標とすることが可能である。ピロリン酸の測定にはさまざまな方法が知られているが、高い感度の期待できる生物発光反応に基づく測定法が有利である。このような測定法として、細胞培養物の2-5A活性をピロリン酸の酵素的な測定系の応用により、吸光度測定した報告が有る[17]。反応原理は次の反応式によって示すとおりである。このような酵素的な反応をピロリン酸の測定法として本発明に応用することができる。酵素的な反応ではRI標識物質を使わないで測定系を構成できるので、設備面では有利であるが、RIAに匹敵する感度を達成するには発光増強剤などの組み合わせが必要な場合も有る。

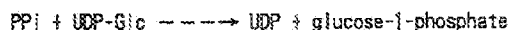
【0023】

【化2】

2-5AS



UDP-Glc pyrophosphorylase



phosphoglucomutase



glucose-6-phosphate dehydrogenase



NADPH + 6-phosphogluconolactone

【0024】ATPの測定法：ATPは2-5AS活性の発現に伴って定量的に消費される物質である。したがって2-5ASによる酵素反応の前後でATP濃度を測定して差を求めれば、原理的には2-5AS活性の指標とすることができる。ATPは一般的な蛍光法で測定しても良いが、2-5AS活性測定には高感度が要求されるので、ルミノール等を用いる化学発光法や、ルシフェラーゼ等を用いる生物発光法で測定するのが好ましい。

【0025】また、本発明は還元剤を含む血液試料中の2'-5'オリゴアデニル酸合成酵素活性安定化剤を提供する。例えば還元剤として2MEを適当な緩衝液、例えばHEPESに溶解し、安定化剤として使用することができる。実際には、2MEとHEPES緩衝液を要時に混合し、2-5AS酵素活性安定化剤とする。また先に2ME-HEPES液を用意しておいて採取した血液に加えてもよい。更に一步進めて採血管に、抗凝固剤とともに入れておき、採血後直ちに均質化処理を行う2-5AS活性測定用採血管としてもよい。

【0026】より具体的には、2-メルカプトエタノールを5～100mM、酢酸マグネシウムを0.5～50mM、塩化カリウムを20～100mM、グリセロールを10～50%含有する1～100mMのHEPES緩衝液 (pH7～8) よりなる処方血液試料中の2-5AS酵素活性安定化剤とする。必要に応じてアジ化ナトリウムのような防腐剤を加えても良い。

【0027】さらに具体的には本発明の2-5AS酵素活性安定化方法を利用した、2-5AS活性測定は次のような手順で行われる。

《血液の採取》EDTA-2Na、ヘパリンなど一般的な抗凝固剤含有採血管などを使用して、血液を採取する。

《血液試料の調製》採取血液を十分に抗凝固剤と混和した後、酵素活性安定化剤900μl (10mM 2ME、3mM 酢酸マグネシウム、50mM KCl、25% グリセリンを含む10mM HEPES緩衝液) があらかじめ分注してある試験管に血液100μlを添加し、十分に混和する。-80℃の超低温槽中、またはド

ライアスをメタノールに加えた急速冷媒中で凍結させ、十分に凍結した後、水浴中で溶解する。この凍結融解を2〜3回繰り返して、血球を破碎し、均質化された試料、つまり血液試料が調製される。本発明の酵素活性安定化剤により、血液は10倍に希釈された状態で調製され、均質化血液試料となる。なお、当酵素活性測定時に用いる測定系は希釈直線性に優れたものであるため、更なる希釈が必要な高値試料は生理食塩水など適当な希釈溶媒を用いて測定時に適宜希釈を行えばよい。

《2-5A合成酵素活性測定方法》上記のように調製した血液試料50μl、酵素活性賦活剤poly(I)poly(C)溶液試薬200μl、基質ATP溶液200μlを一つの試験管内で混和し、37度の温浴中で30分間反応を遂行させる。この反応で、試料中の当酵素の触媒活性により基質ATPが重合し、2-5Aが生成する。酵素反応終了後、¹²⁵I標識2-5A溶液200μl、抗2-5A抗血清溶液試薬200μlを混和し、37℃の温浴中で1時間反応させる。反応終了後、遠心分離によってB/F分離を行い、上清中の未反応分画を吸引除去する。以上のような操作手順によって得られた各反応チューブの放射線量をガンマカウンターで測定する。この測定操作によって生成された2-5Aの量を標準曲線から算定する。

【0028】

【作用】本発明における還元剤の正確な作用機序は不明である。しかし、本来細胞内酵素である2-5ASは、血清中に単独で存在するよりも、血球成分とともに存在する均質化した血液試料中の方が安定性は高い。しかしそれでも空気中の酸素といった酸化成分による酸化を受けて失活するものと考えられ、2ME等の還元剤はその酸化反応を防止するものと推定される。

【0029】

【発明の効果】現在、血清試料を用いて測定されている血中2-5AS活性は、血球成分から漏出した一部分の酵素の活性を測定しているに過ぎず、また安定性に関しても血清試料は経時的に急激に活性を失う。これに対し全血血液の血球成分を破壊し均質化して均一な溶液状態とした血液試料は、より直接的に潜在する2-5AS酵

素活性の絶対量を測定することができる。しかし全血試料は、実際の臨床検査の場合では-80℃で保存されているが、それでも安定性が不足しており、-80℃で保存しても酵素活性は経時的に低下する。それ故、2-5AS活性を安定化する方法が望まれていた。本発明は、全血血液を適当な緩衝液中で均質化した血液試料中に還元剤を共存させることにより、血液試料中の酵素活性を安定化した。具体的には、2MEを含むHEPES緩衝液中で全血血液を均質化することにより、2-5AS活性を4℃保存でも少なくとも7日間にわたって安定に維持することを可能とした。また高価なディープフリーザーの使用も不要とした。この技術は血球成分に由来する酵素の安定化に有用であり、病態との関連をダイレクトに示す血球成分中の酵素活性を安定化し、試料の保存を容易としたので血球中酵素の測定系の発展に貢献すると考えられる。

【0030】

【実施例】以下、実施例に基づき本発明を詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。本発明において2-5AS活性測定は、酵素反応により生成した2-5Aを二抗体RIA法で測る方法を採用した【16】。測定操作フローを図1に示した。また得られた検量線を図2に示した。2-5AS酵素活性は生成した2-5Aの濃度(pmol/dl)で表わされる。

【0031】参考例 -20℃で凍結保存した全血血液の安定性

-20℃で1週間凍結保存した全血血液中の2-5AS活性の安定性を、-80℃で一週間保存した全血血液中の2-5AS活性と比較。

操作：ヘパリン採血した血液を-20℃及び-80℃で7日間凍結保存し、酵素活性測定直前に融解し、均質化した血液試料の活性を測定した。試料の希釈は生理食塩水で行った。結果を表1に示す。表1に示すように、2-5ASは不安定な酵素であり、-20℃で凍結保存しても全血血液中の2-5ASは、-80℃保存の血液と比較して、血液によっては40%以上失活した。

【0032】

【表1】

試料No.	-80℃ pmol/dl	-20℃ pmol/dl	-20℃/-80℃ %
No. 1	974.9	394.6	58.5
No. 2	8888.0	7640.0	85.9
No. 3	3480.0	2393.0	57.9

【0033】実施例1 血液試料の調製法（希釈溶媒の選択）

血液試料の調製に用いる希釈溶媒の選択を行った。ヘパリン採血した血液を、20mM HEPES、生理食塩水、精製水、MEM、及び10mM 2MEを含む10

mM HEPES (HEPES+2ME) で10倍希釈し、凍結融解1回で均質化した血液試料を測定し、測定値を比較した。結果を表2に示す。

【0034】

【表2】

試料No.	HEPES pmol/dl	生理食塩水 pmol/dl	精製水 pmol/dl	MEM pmol/dl	HEPES + 2ME pmol/dl
No. 4	629.6	359.3	535.6	426.3	831.3

【0035】 HEPES+2ME緩衝液系が最も良い結果を与えた。またHEPESは2-5AS活性測定に用いる緩衝液でもあるので、希釈溶媒としてはHEPESを選択し、HEPES+還元剤を、今後の血液試料の調製に使用することとした。またHEPES+還元剤を、2-5AS活性試活剤であるpoly (I) poly (C) 試薬や基質であるATP溶液の溶解にも用いることとした。なお、MEM希釈試料はフィブリンの形成が見られ、MEMは血液希釈用溶媒には不適當であった。

【0036】 実施例2 血液試料の調製法（凍結融解の

回数を選択）

全血血液を均質化するのに最適な凍結融解の回数の選択を行った。ヘパリン採血した全血血液を10mM HEPES+10mM 2MEで10倍希釈し、均質化する際の凍結融解の回数を1～4回に変えて試料を調製し、2-5AS活性を測定し、測定値を比較した。結果を表3に示す。

【0037】

【表3】

試料No.	凍結融解の回数			
	1回 pmol/dl	2回 pmol/dl	3回 pmol/dl	4回 pmol/dl
No. 4	831.3	967.5	980.5	902.3

【0038】 表3より、凍結融解2回または3回で測定値が最大となる。操作の容易性を考えて凍結融解2回を選択し、今後の均質化に使用した。

【0039】 実施例3 血液試料の調製法（希釈と凍結融解の順序の選択）

ヘパリン採血した血液を、10mM HEPES+10

mM 2MEで希釈し、凍結融解2回の血液試料の2-5AS活性を測定した。希釈／凍結融解の操作順序を変えて測定値を比較した。結果を表4に示す。

【0040】

【表4】

A：凍結融解後希釈

B：希釈後凍結融解

試料No.	A pmol/dl	B pmol/dl
No. 5	913.6	954.8
No. 6	10122.0	9314.0
No. 7	3802.0	3817.0

【0041】 どちらの操作でも測定値に差がないので、凍結融解操作のやりやすさから、操作B：希釈後凍結融解を選択した。

【0042】 実施例4 血液試料の調製法（抗凝固剤の選択）

EDTA採血及びヘパリン採血した全血試料を10mM HEPES+10mM 2MEで希釈後、凍結融解を2回行い、均質化した血液試料を測定した。結果を表5に示す。どちらの抗凝固剤を用いても測定値に差は見られなかった。

【0043】

【表5】

試料No.	EDTA pmol/dl	ヘパリン pmol/dl
No. 8	900.9	962.4
No. 9	10339.2	11232.0
No. 10	3823.2	3769.6

【0044】 実施例5 血液試料の保存安定性

ヘパリン採血した全血血液を、10mM 2ME、3mM 酢酸マグネシウム、50mM KCl、2.5% グリセリンを含む10mM HEPES緩衝液（pH7.5）よりなる2-5AS酵素活性安定化剤で希釈し、凍結融解を2回行い、均質化した血液試料を4℃で7日間保存し、安定性を調べた。結果を表6に示す。

【0045】

【表6】

試料No.	0日 pmol/dl	3日 pmol/dl	7日後 pmol/dl	0日/7日 %
No. 11	816.7	828.9	714.0	87.4
No. 12	9408.0	10184.0	9394.0	99.9
No. 13	3198.0	2804.0	2952.0	92.3

【0046】表6に示されるように、本発明の酵素活性安定化剤で希釈・均質化された血液試料は冷所で7日保存後であっても、その酵素活性を良好に保持しており、安定であった。

【0047】REFERENCES:

- [1] 免疫薬理、1、80-88、1983
- [2] Biomedicine & Pharmacotherapy, 37, 176-180, 1983
- [3] Hepatology, 8, 366-370, 1988
- [4] 臨床検査、39、1461-1464、1995
- [5] 臨床病理、42 (補冊)、96、1994
- [6] 特公昭46-29785号
- [7] 特公昭61-17464号
- [8] 特公昭60-27516号
- [9] 特公平1-42679号
- [10] 特公平1-42680号
- [11] 特公平1-55880号

[12] 特公平2-44520号

[13] Progress in clinical and biological research. Vol. 202, 1985, 'The 2-5A System - Molecular and clinical aspects of the interferon-regulated pathway' p97-104

[14] Nature 288 (13), 189-192, 1982

[15] J. Biol. Chem., 259 (3), 1727-1730, 1984

[16] 特開平9-107993号

[17] Anal. Biochem. 207, 90-93, 1992

【図面の簡単な説明】

【図1】2-5AS活性測定法フロー

【図2】2-5AS活性標準曲線

【図1】

【図2】

〈標準曲線作成用〉 (酵素活性既知)	
検体 or 標準2-5A溶液 or コントロール血清	50 μ l
poly(I)poly(G)	200 μ l
ATP溶液	200 μ l
↓ 混和、37℃温浴中、30分 (酵素反応)	
¹²⁵ I-標識2-5A	200 μ l
2-5A抗血清懸濁液	200 μ l
↓ 混和、37℃温浴中、1時間 (免疫反応)	
↓ 遠心分離 (3000rpm)、4℃、30分	
↓ 上清除去	
↓ カウント	

